

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER  
EKTOANTIGENE VON BABESIA RODHAINI,  
BABESIA GALAGOLATA UND BABESIA  
CANIS IN DER IMMUNODIFFUSION, GEGEN-  
STROMELEKTROPHORESE UND IM ELISA-  
TEST

Hubertus Graf zu Dohna

1977





Buch- und Offsetdruckerei

Johann Prechter

8858 Neuburg / Donau

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin  
und Parasitologie des Fachbereichs Tiermedizin  
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

---

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER EKTOANTIGENE  
VON BABESIA RODHAINI, BABESIA GALAGOLATA UND  
BABESIA CANIS IN DER IMMUNODIFFUSION, GEGEN-  
STROMELEKTROPHORESE UND IM ELISA-TEST

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Hubertus Graf zu Dohna  
aus  
Bern

München 1977



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Tiermedizin der Universität  
München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus  
Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. D. Stavrou

Tag der Promotion: 25. Februar 1977



Meinen lieben Eltern gewidmet



## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                            | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| I. Einleitung .....                                                                                                        | 1     |
| II. Die serodiagnostische Anwendung somatischer<br>und metabolischer Antigene von Babesien<br>(anhand der Literatur) ..... | 2     |
| III. Eigene Untersuchungen                                                                                                 |       |
| A. Material und Methoden                                                                                                   |       |
| Antigengewinnung .....                                                                                                     | 12    |
| Gewinnung der Hochimmunseren .....                                                                                         | 15    |
| Säulenchromatographische Fraktionierung der<br>Ektoantigene .....                                                          | 16    |
| Serologische Methoden<br>(Immunodiffusion, Gegenstromelektrophorese,<br>ELISA-Test) .....                                  | 17    |
| B. Ergebnisse                                                                                                              |       |
| Elutionskurven und Eiweißbestimmung der<br>Antigen-Fraktionen .....                                                        | 21    |
| Präzipitationen der Antigen-Fraktionen in<br>der Immunodiffusion und Gegenstromelektro-<br>phorese .....                   | 23    |
| Reaktionen der Antigen-Fraktionen im ELISA-<br>Test .....                                                                  | 25    |
| IV. Besprechung der Ergebnisse .....                                                                                       | 29    |
| V. Zusammenfassung und Summary .....                                                                                       | 37    |
| VI. Literaturnachweis .....                                                                                                | 39    |
| Lebenslauf                                                                                                                 |       |



## I. Einleitung

Die Babesiose der Haustiere ist trotz wirksamer Chemotherapeutika auch heute noch in bestimmten Gebieten Afrikas enzootisch. Die große Zahl latent infizierter, klinisch gesund erscheinender Haus- und Wildtiere stellt eine ständige Infektionsquelle dar.

Für eine wirksame Bekämpfung der Babesiose ist die Erkennung der Trägertiere von entscheidender Bedeutung. In der Regel wird der direkte Erregernachweis im gefärbten Blutausstrich geführt. Darüberhinaus sind verschiedene serologische Methoden in Erprobung, für deren Effektivität und Artspezifität die Anwendung reiner Antigene erforderlich ist.

Ziel meiner Arbeit war es, Antigene verschiedener Babesienarten in reiner Form darzustellen und damit die Möglichkeit einer artspezifischen Diagnose von Babesiosen in der Immunodiffusion, Gegenstromelektrophorese und im ELISA-Test zu untersuchen.

## II. Die serodiagnostische Anwendung somatischer und metabolischer Antigene von Babesien ( anhand der Literatur )

---

Im letzten Jahrzehnt gewann die Serodiagnostik von Babesiosen immer mehr an Bedeutung. Die verschiedensten Methoden wurden auf ihre Anwendbarkeit in der Babesienserologie geprüft bzw. modifiziert. Dabei kamen Antigene zur Anwendung, die aus parasitierten Erythrozyten, Plasma, Serum oder Gewebe von mit Babesien infizierten Tieren stammten. Die Ergebnisse waren jedoch so unterschiedlich, daß weitere Untersuchungen notwendig erschienen.

TODOROVIC (1975) erstellte eine Übersicht über die gebräuchlichsten serologischen Methoden. HIRATO und M. (1945) verwendeten erstmals die Komplementbindungsreaktion (KBR) und konnten Babesienantikörper 11 bis 15 Tage nach Auftreten der Parasitaemie nachweisen. In den 70er Jahren gewann die indirekte Immuno-Fluoreszenz an Bedeutung. Auch die Gelpräzipitation, die Kapillaragglutination, die Objektträgeragglutination und der Babesia-Card Test kamen zur Anwendung. Das Hauptproblem der Babesienserologie liegt in der Schwierigkeit der reinen Darstellung von Antigenen. Viele Autoren berichten über die Anwendung somatischer Antigene, nur wenige arbeiteten mit metabolischen Antigenen.

Aus der umfangreichen Literatur der Babesienserologie habe ich Arbeiten ausgewählt, die sich mit der Herstellung und Analyse somatischer und metabolischer Antigene und ihrer serodiagnostischen Anwendung zum Nachweis spezifischer Antikörper befassen. Die aus körpereigenen Substanzen gewonnenen somatischen Antigene spielten bisher die bedeutendere Rolle; sie werden deshalb zuerst beschrieben werden.

SIBINOVIC (1966) isolierte ein lösliches somatisches Antigen aus dem Hämolysat mit *Babesia caballi* und *Babesia equi* infizierter Pferdeerythrozyten mit der von RISTIC und SIBINOVIC (1964) beschriebenen Methode. Dabei wurde die Membran gewaschener Erythrozyten durch Ultraschall gesprengt und das Antigen im Überstand mit Protraminsulfat ausgefällt. Dieses sogenannte Protraminsulfat (PS)-Antigen wurde in der Immunodiffusion verwendet. Es bestand hauptsächlich aus Mucoproteinen. Papierelektrophoretisch ergaben sich zwei Substanzen, die in babesienfreien Kontrollerythrozyten nicht vorhanden waren. Nach Kochen des PS-Antigens fiel ein serologisch inaktives Präzipitat aus, während der aus Polysacchariden bestehende Überstand serologisch aktiv blieb und als boiled PS (BPS)-Antigen bezeichnet wurde. Beide, PS- und BPS-Antigene, reagierten mit Seren von Pferden mit chronischer Babesiose, jedoch nicht mit Seren von Hunden und Ratten, die eine Infektion mit *Babesia canis* bzw. *Babesia rodhaini* überstanden hatten.

VIZCAINO und TODOROVIC (1973) trennten die aus dem Hämolysat von mit *Babesia bigemina* bzw. *Babesia argentina* infizierten Rindererythrozyten gewonnenen Antigene säulenchromatographisch an Sephadex G-200 von fremden Substanzen. Es gelang ihnen, in der Agargeldiffusion und Immunelektrophorese art- und gattungsspezifische Antigene nachzuweisen.

GOODGER (1971) isolierte zwei somatische Antigene von *B. argentina*, die im indirekten Hämagglutinationstest reagierten. Ein Antigen wurde durch Gelfiltration aus löslichen Bestandteilen gewonnen, die man durch Beschallen von Parasitensuspensionen erhielt. Das zweite Antigen stellte der Autor her, indem er zuerst das Hämoglobin an der DEAE-Zellulose beseitigte und den Rest an Sephadex-Gel trennte. Dabei erhielt er drei Fraktionen; die ersten beiden waren serologisch aktiv, die dritte inaktiv. Beide Antigene zeigten hohe Titer (1:12000 - 1:25000) mit *B. argentina* homologen Antiseren. Ein *B. bigemina* Antigen, das man auf dieselbe Weise gewann, zeigte mit homologen Antiseren niedrigere Titer (1:1600) und starke Kreuzreaktionen (1:1600) mit *B. argentina* Antiseren. Die Kreuzreaktionen konnten mit *B. argentina* Antigen adsorbiert werden, ohne die spezifischen *B. bigemina* Reaktionen zu beeinflussen.

LEEFLANG und PERIE (1972) untersuchten die serologischen Unterschiede und die antigene Verwandtschaft zwischen Babe-

sia bigemina, B. major, B. argentina und B. divergens in Rindern mit Hilfe des indirekten Fluoreszenztestes. Für die Antigenherstellung nahmen sie Blut von hochparasitärischen Tieren, wobei der Zusatz von PBS-Puffer die Koagulation verhinderte. Nach der Zentrifugation befreiten sie das Antigen von Serumbestandteilen durch dreimaliges Waschen des Sedimentes mit PBS. Dicke Blutfilme wurden auf Objektträger aufgebracht und in der Fluoreszenz ausgewertet. Die Hochimmunseren infizierter Kälber wurden sowohl gegen homologe, als auch gegen heterologe Antigene getestet. Die Titer gegen heterologe Antigene waren immer niedriger als die gegen homologe. Kreuzreaktionen traten auf, beeinflussten jedoch nicht die Artspezifität der verwendeten somatischen Antigene. Die Autoren stellten fest, daß sich die Kreuzreaktionen unter den verwendeten Babesienarten durch unterschiedlich hohe Titer auszeichneten. Dies zeigt, daß die antigene Verwandtschaft auf verschiedenen Teilantigenen beruht. Es dürften daher artspezifische, sowie ein oder mehrere gattungsspezifische Antigene vorhanden sein.

ZWART und M. (1968) kamen in ihren Untersuchungen auch zu dem Ergebnis, daß die Titerunterschiede zwischen homologen und heterologen Seren so auffallend sind, daß der indirekte Fluoreszenztest zur Unterscheidung zwischen B. bigemina und B. major in Rindern geeignet ist. COX und TURNER (1970)

bestätigten, daß zwei morphologisch gleiche Parasiten der Maus, *Babesia rodhaini* und *B. microti*, im indirekten Fluoreszenztest gut zu unterscheiden waren.

Aus der genannten Literatur geht hervor, daß trotz großer Fortschritte in der serologischen Artdiagnose häufig Kreuzreaktionen auftreten, so daß somatische Antigene nur mit Vorbehalt in der Serodiagnose spezifischer Babesien-Infektionen angewendet werden können. Um diese Probleme zu lösen, erprobten einige Autoren ein von seiner Entwicklung und Lokalisation unterschiedliches Antigen auf seine Verwendbarkeit und Artspezifität in der Babesienserologie. Da es hauptsächlich aus Stoffwechselprodukten des Parasiten besteht, nannten sie es ein metabolisches, serumlösliches oder auch ein Ektoantigen.

SIBINOVIC und M. (1965) gelang es, ein lösliches Antigen im Serum von Pferden, die mit *B. caballi* infiziert waren, nachzuweisen. Hochparasitämisches Serum reagierte dabei in der Agargel-Präzipitation mit dem Hochimmuserum eines latent infizierten Pferdes. Mit Hilfe der Papierelektrophorese konnte das Serum in 32 Fraktionen aufgetrennt werden, wovon 7 ein Antigen besaßen, das im normalen Rinderserum fehlte. Es reagierten jedoch nur zwei Fraktionen mit dem spezifischen Antiserum. Die Autoren halten die übrigen Fraktionen für unspezifische Serumveränderungen, die infolge der Infektion entstanden.

In einer weiteren Untersuchung trennten SIBINOVIC und M. (1967) die Serumantigene frisch infizierter Pferde, Hunde und Ratten säulenchromatographisch auf. So konnten die Antigene von allen Serumbestandteilen mit Ausnahme der  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ -Globuline und der  $\gamma$ -Globuline getrennt werden. Aus den so erhaltenen Serumantigenen wurden mit der Gradientenzentrifugation zwei weitere Fraktionen, A und B, isoliert. Die serologische Spezifität der Antigene wurde in der Gelpräzipitation durch Ansatz mit homologen und heterologen Antiseren der drei Tierarten geprüft. Starke Kreuzreaktionen zwischen den Antigenfraktionen A und B und allen Antiseren traten auf. Anhand der Präzipitationsmuster konnte nachgewiesen werden, daß die Antigenfraktionen A und B der drei Tierarten identisch waren, jedoch untereinander unterschiedliche Antigene darstellten.

TODOROVIC und M. (1971) untersuchten die antigene Beziehung zwischen serumlöslichen Antigenen von *Babesia bigemina* und *B. argentina* in der Immunodiffusion. Sie isolierten Antigene aus Plasma, das während der frischen Phase der Infektion gewonnen wurde. Starke Kreuzreaktionen traten in homologen und heterologen Ansätzen auf.

Um der Unspezifität der Serumantigene auf die Spur zu kommen, untersuchten einige Autoren ihre physiologischen Eigenschaften und chemische Zusammensetzung. FERRIS und M.

(1968) diskutierten die Bedeutung und Anwendbarkeit von Serumantigenen in der Serodiagnose. Eine neue Terminologie wurde für lösliche Antigene vorgeschlagen, die während der frischen Phase der Infektion im Serum oder Plasma auftraten. Da sie nicht mit erythrozytären Antigenen identisch waren, bezeichnete man sie als "Ektoantigene". Die Untersuchungen ergaben, daß sie aus Peptiden, Phosphatiden, Lipiden und Polysacchariden bestanden und sowohl für die Stimulation schützender Antikörper als auch in der Diagnose akuter und chronischer Babesiosen bei Mensch und Tier angewendet werden können.

Daraufhin untersuchten SIBINOVIC und M. (1969) die Wirkung der Serumantigene auf parasitierte und intakte Erythrozyten. Es gelang ihnen, mit der Fluoreszenz metabolische Antigene in infizierten Erythrozyten nachzuweisen. Im gesamten Zytoplasma und an der Zytoplasmamembran zeigte sich diffuse bzw. intensive Fluoreszenz. Die Autoren sind der Meinung, daß die Antigene Stoffwechselprodukte darstellen, die während der Entwicklung der Parasiten ins Zytoplasma diffundieren und sich an der Erythrozytenmembran anlagern. Zum selben Ergebnis kamen auch MAHONEY und GOODGER (1972) bei der Untersuchung von B. argentina-infizierten Rindererythrozyten.

Bereits 1969 fanden MAHONEY und GOODGER zwei antigene Substanzen im Serum von Tieren mit frischer Babesia argentina-

Infektion. Antiserum gegen infiziertes Kälberserum, in Kaninchen hergestellt, wurde mit normalem Kälberserum adsorbiert. Es enthielt präzipitierende Antikörper gegen Komponenten, die im normalen Kälberserum fehlten. Aus diesem Serum versuchten die Autoren antigene Substanzen zu charakterisieren. Eine dieser Substanzen war immunologisch identisch mit bovinem Fibrinogen. Das zweite Antigen schien ein pigmentierter makromolekularer Komplex zu sein, der auch im normalen Rindergewebe zu finden ist. Lösliche Serumantigene parasitischer Herkunft waren nicht nachweisbar. Die Verfasser schlossen daraus, daß sie entweder keine starke Präzipitation induzierten oder in so geringen Mengen vorhanden waren, daß sie die Empfindlichkeit des Geldiffusions-Testes überschritten.

TÜLLMANN (1976) prüfte somatische und metabolische Antigene von *Babesia rodhaini* und *B. musculi* aus Blut hochparasitärmischer Mäuse auf ihre serologischen Eigenschaften in der Immunodiffusion, Gegenstromelektrophorese und Immunelektrophorese. Sie isolierte zwei Antigene, ein metabolisches aus infiziertem Plasma und ein somatisches Extraktantigen aus dem hämolysierten und gewaschenen Sediment. Mit diesen Antigenen war jedoch nur ein gattungsspezifischer Antikörpernachweis möglich. Erst nach säulenchromatographischer Fraktionierung der serumlöslichen, metabolischen Antigene an Sephadex G-200 ließen sich bei *B. rodhaini* und *B. mus-*

culi gewisse artspezifische Reaktionen nachweisen. Die Autorin kam zu dem Ergebnis, daß nach säulenchromatographischer Auftrennung die Möglichkeit einer reineren Darstellung der Antigene bestünde und somit ein spezifisches Antigen für die serologische Differenzierung verschiedener Babesienarten isoliert werden könnte.

In meinen Versuchen verwendete ich drei serologische Methoden zum Nachweis von Babesienantikörpern: die Immundiffusion, die Gegenstromelektrophorese und den ELISA-Test. Die Anwendbarkeit der Immundiffusion ist bereits oben beschrieben worden. Über die Anwendung der Gegenstromelektrophorese wird in der Literatur nur von TÜLLMANN (1976) und EGER (1976) berichtet, die den Test nach Anleitung der Behringwerke AG für den Amöbennachweis durchführten. Sie verwendeten somatische und metabolische Antigene von *Babesia rodhaini*, *B. musculi* und *B. galagolata*. Es zeigte sich dabei, daß die somatischen Antigene eine breitere immunogene Wirkung im Sinne einer Kreuzimmunität besaßen, die metabolischen Antigene hingegen eher zum Nachweis artspezifischer Antikörper geeignet waren.

Ähnlich wie der Fluoreszenztest dient der Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) vorwiegend zum Nachweis von Serumantikörpern gegen die verschiedensten Erreger. Der von ENGVALL und PERLMANN (1972) entwickelte Test wird

in der Parasitologie insbesondere zum Nachweis von Serumantikörpern gegen *Trichinella spiralis* verwendet (RUITENBERG und M., 1975). Lediglich eine Arbeit von VOLLER und M. (1976) berichtet über die Anwendung des ELISA-Tests zum Nachweis von Serumantikörpern gegen *Babesia divergens* im Rind. Sie stellten fest, daß Antikörper erst einige Wochen nach der Infektion nachweisbar sind. Über das verwendete Antigen liegen keine Angaben vor.

In der vorliegenden Arbeit sollte auch der ELISA-Test auf seine Anwendbarkeit und eventuelle Artspezifität zum Nachweis von Babesienantikörpern geprüft werden.

### III. Eigene Untersuchungen

#### A. Material und Methoden

Als Versuchstiere dienten NMRI-Mäuse, Beagle Hunde und Kaninchen. Die 20 - 25 g schweren Mäuse und die 10 - 15 kg schweren Beagles stammten aus der institutseigenen Zucht. Ein lokaler Züchter lieferte die Kaninchen, die ein Gewicht von 2 - 3 kg hatten.

Die Mäuse wurden in Makrolonkäfigen bei einer Raumtemperatur von 20° C gehalten. Als Futter erhielten sie Altromin-Mäusehaltungsdiät und Wasser ad libitum. Die Kaninchen lebten in Metalleinzelkäfigen; ihr Futter bestand aus Altromin-Kaninchenhaltungsdiät und Wasser. Die Hunde waren in Hütten mit Auslauf untergebracht und erhielten Altromin-Hundehaltungsdiät, Wasser und gelegentlich Happy-Dog Fleischersatz.

Die in meinen Versuchen verwendeten Parasitenarten umfaßten *Babesia rodhaini*, *B. galagolata* und *B. canis*. *B. rodhaini* und *B. galagolata* wurden in Mäusen, *B. canis* in Hunden gezüchtet.

Für eine ausreichende Antigenproduktion in Mäusen sorgte eine intraperitoneal injizierte Menge von 0,3 ml babesien-

haltigem und mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntem Citrat-Blut. Das Infektionsmaterial stammte aus Tieren, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Parasitaemie von 700 ‰ aufwiesen. Die Hunde erhielten 5 ml 20 ‰ B. canis-haltiges, verdünntes Citrat-Blut intravenös. Der Höhepunkt der Parasitaemie wurde durch tägliche Auszählung der Parasiten bestimmt. Nach der Schnellfärbemethode Diff Quick der Firma Harleco beziehungsweise nach Giemsa gefärbte Blutaussstriche erwiesen sich dafür als besonders geeignet. Es wurden 500 Erythrozyten bei 1000-facher Vergrößerung ausgezählt und die Anzahl der mit Babesien befallenen roten Blutkörperchen in Promille angegeben.

Die Antigengewinnung erfolgte auf dem Höhepunkt der Parasitaemie (B. rodhaini erreichte 800 - 850 ‰, B. galagolata 750 - 800 ‰ nach Entmilzung). Die Mäuse wurden getötet, der Brustkorb eröffnet, ein Herzschnitt angelegt und das Blut mittels einer Pasteurpipette gewonnen. Natrium-Citrat im Verhältnis 1:20 verhinderte die Blutgerinnung. Pro Babesienart mußten ca. 300 Mäuse infiziert und entblutet werden. Bei den Hunden erfolgte die Entnahme von 40 - 50 ml Blut aus der Unterarmvene, wenn die Tiere eine Parasitaemie von 300 - 400 ‰ mit B. canis zeigten.

Für meine Untersuchungen verwendete ich das serumlösliche oder metabolische Antigen (A II), das intraerythrozytär

gelöste metabolische Antigen (A III) und das somatische Gesamtantigen (A I).

Babesienhaltiges Citrat-Blut wurde 15 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert, das Plasma abpipettiert, säulenchromatographisch fraktioniert, dialysiert, lyophilisiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dieses stellte das serumlösliche oder metabolische Antigen (A II) dar.

Zur Reinigung des parasitenhaltigen Zellsedimentes von Serumbestandteilen erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS-Phosphat-Puffer pH 7,4 und Zentrifugation von je 15 Minuten bei 3000 Upm. Das Sediment wurde auf das ursprüngliche Volumen resuspendiert. Die Freisetzung der Babesien geschah mittels Aqua dest.-Hämolysen im Verhältnis 1:9. Durch Zugabe von gleichem Volumen doppelt physiologischen PBS-Puffers konnte nach einer Minute die Isotonie wieder hergestellt werden. Bei diesem Verfahren blieben die Parasiten unbeschädigt. Das Hämolysat wurde 20 Minuten bei 13000 Upm in einer gekühlten Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand enthielt den gelösten, stark verdünnten Zellinhalt der Blutkörperchen, den ich intraerythrozytäres Antigen (A III) nannte. Für die säulenchromatographische Fraktionierung mußte es gegen 1/20 PBS-Puffer dialysiert, lyophilisiert und im Verhältnis 1 Teil Aqua destillata zu 20 Teilen Antigen gelöst werden.

Der zurückgebliebene Bodensatz bestand hauptsächlich aus geplatzen Erythrozytenhüllen, Leukozyten und abgetöteten Babesien. Dies entsprach dem somatischen Gesamtantigen (A I) und wurde ausschließlich für die Immunisierung verwendet.

Zur Herstellung von Hochimmunseren immunisierte ich Mäuse, Kaninchen und Hunde mit den entsprechenden Babesienarten. Die Immunisierung mit *Babesia rodhaini* und *B. galagolata* erfolgte in je 20 NMRI-Mäusen und je 2 Kaninchen, die mit *B. canis* in einem Beagle und 2 Kaninchen. Als Kontrollen dienten Tiere, die mit gewaschenen Erythrozytenhüllen und Leukozyten von Hund und Maus (Antigenspender) und Freund'schem Adjuvans allein immunisiert worden waren.

Eine Emulsion aus gleichen Teilen Antigen und Freund'schem Adjuvans kam bei der ersten Immunisierung zur Anwendung. Die Mäuse erhielten je 0,3 ml s. c. auf zwei Stellen an der seitlichen Brustwand. Nach vier Wochen erfolgte eine Boosterung mit 0,3 ml Antigen ohne Zusatz von Freund'schem Adjuvans intraperitoneal.

Bei den Kaninchen wurden 2 ml Antigen mit 2,5 ml Adjuvans emulgiert und pro Tier 2 ml davon s. c. auf zwei Stellen an der seitlichen Brustwand injiziert. Für die zweite Immunisierung nach 4 Wochen reichten 2 ml Antigen ohne Adjuvans i. p. verimpft aus.

Für die Hunde genügte die Verteilung einer Emulsion aus 5 ml Antigen und 5 ml Adjuvans auf zwei Stellen tief in die Sitzbeinmuskulatur. Die zweite Immunisierung erfolgte 4 Wochen später mit 5 ml Antigen ohne Zusatz von Adjuvans intramuskulär.

Bei allen Tieren wurden 2 Wochen nach der Boosterung Hochimmunseren gewonnen.

Die säulenchromatographische Auftrennung der löslichen Antigene in Fraktionen erfolgte an dem Molekularsieb Sephadex G-200 und Ultrogel ACA 34. Die Aufbereitung des Gels und die Isolierung der Fraktionen geschah nach Anleitung des Herstellers. Die Gelbetthöhe betrug 50 cm bei einem Durchmesser von 2,5 cm. Als Elutionsflüssigkeit diente PBS-Phosphatpuffer mit pH 7,4. Die Durchflusgeschwindigkeit betrug 16 ml/Std. Die Messungen erfolgten bei 254 nm. Die Elutionskurven ergaben die Fraktionen, die automatisch gesammelt wurden.

Anschließend dialysierten die in Zellophanschläuchen abgefüllten Fraktionen 24 Stunden bei 4° C gegen 1/10 PBS-Puffer und wurden dann in Portionen von je 2 ml lyophilisiert. Für die serologischen Tests erfolgte eine Eindickung von 10:1 bzw. 5:1.

Der Agargel-Mikro-Präzipitationstest nach OUCHTERLONY (1965) wurde zum Nachweis von präzipitierenden Antikörpern herangezogen. Die Herstellung der Agarplatten erfolgte auf Kunststoffrahmen, die in zwei Abschnitte für je drei Objektträger unterteilt und auf Nivelliertische gespannt waren. Die zum Abdichten der Zwischenräume verwendete 3 %-ige Agarose wurde nach Erkalten wieder vorsichtig abgehoben. Anschließend beschichtete ich die Platten mit 1,5 % Agarose, die in einer Diäthyl-Barbiturat-Pufferlösung mit pH 8,2 und einer Ionenstärke von 0,1 hergestellt worden war. Nach dem Erstarren härteten die Agarplatten für einige Stunden im Kühlschrank. Die für die serologischen Tests mit Einfüllöchern versehenen Objektträger wiesen ein Zentralloch auf, um das sich kreisförmig 6 periphere Vertiefungen anschlossen. Ihr Abstand untereinander betrug 8 mm, ihr Durchmesser 4 mm. Die fertigen Platten wurden mit den Reagentien beschickt und 48 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4° C aufbewahrt. Dann erfolgte eine Wässerung von 24 Stunden. Die Trocknung fand bei 37° C im Brutschrank statt. Die Färbung der Objektträger mit Amidoschwarz 10 B ergab eine bessere Darstellung der Präzipitationsbanden.

Die Gegenstromelektrophorese, nach Anleitung der Behringwerke für *E. histolytica* ausgeführt, ist wegen ihrer großen Empfindlichkeit und schnellen Präzipitatbildung als Such-

test besonders geeignet. Die Herstellung der Agarplatten geschah in gleicher Weise wie für die Immunodiffusion. Im Abstand von 2,5 cm waren Doppelreihen mit jeweils drei Einfülllöchern eingestanz. Die Antigene wurden in die Lochreihe zur Kathode eingefüllt, die Antiseren und Kontrollseren in die anodenwärts gerichtete Lochreihe. Den Kontakt zwischen Agarplatten und Puffer stellte feuchtes Filterpapier her. Die für die Elektrophorese verwendete Kammer der Firma Camag war an ein Standardspeisegerät für 500 Volt angeschlossen. Die Elektrophorese dauerte 45 Minuten bei einer Spannung von 300 Volt und einem Stromdurchfluß von 8 mA pro zwei Rahmen. Nach Wässern, Trocknen und Färben konnten die Präzipitationsbanden erfaßt werden.

Ähnlich wie der Fluoreszenz-Test dient der Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) nach ENGVALL und PERLMANN (1972) hauptsächlich zum Nachweis von Serumantikörpern. Mit Hilfe dieses Verfahrens werden spezifische Antikörper durch enzym-gekoppelte Antiglobuline in antigen-beschichteten Platten nachgewiesen. Das nach Ablauf der Antigen-Antikörper-Reaktion in den Platten spezifisch gebundene Enzym spaltet ein Substrat, das eine Farbreaktion zur Folge hat, welche den Antikörpergehalt sichtbar macht und eine Titerbestimmung ermöglicht. Der Kunststoff Polystyrol besitzt die Fähigkeit, Proteinmoleküle an seiner Oberfläche fest zu binden. Antigene (Proteine) lassen sich so in Poly-

styrolmikrotiterplatten anlagern und können mit hinzugegebenen Serumantikörpern spezifische Reaktionen eingehen.

In meinen Untersuchungen wurden im ELISA-Test die gleichen metabolischen Antigene verwendet wie für die Immunodiffusion und Gegenstromelektrophorese. Für die Beschichtung der Mikrotiterplatten hat sich eine Eiweißkonzentration des löslichen Antigens von  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  als ausreichend erwiesen. In jede Vertiefung der Polystyrolmikrotiterplatten wurden  $0,05\text{ ml}$  Antigenlösung einpipettiert, eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{ C}$  inkubiert und über Nacht mit Klebefolie dicht verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt. Vor Gebrauch mußte die Antigenlösung mit Leitungswasser ausgewaschen werden.

Um unspezifische Anlagerungen von Immunglobulinen an der Polystyrolwand zu vermeiden, wurden in jede Vertiefung  $0,05\text{ ml}$   $2\%$ iges in PBS-Coons-Puffer gelöstes Rinderserum-Albumin mit Tween 20 ( $0,05\%$ ) vorgelegt. In die erste Lochreihe pipettierte ich  $0,05\text{ ml}$  der  $1:5$  vorverdünnten Seren. Ausgehend von dieser Lochreihe wurde mit Mikrodilutern (Mikrotitersystem der Fa. Cooke, Größe  $0,05\text{ ml}$ ) eine zweifache Serumverdünnungsreihe ( $1:10$ ,  $1:20$ , etc.) hergestellt. Nach einstündiger Inkubation bei  $37^{\circ}\text{ C}$  folgte eine dreimalige gründliche Spülung mit Leitungswasser. Anschließend kam das mit Peroxydase gekoppelte Antiglobulin (Schaf-Anti-Kaninchen Globulin-PO bzw. Schaf-Anti-Maus

Globulin-PO des Instituts Pasteur bzw. Anti-Hund Globulin-PO der Fa. Nordic Immunological Laboratories) in der Verdünnung 1:200 hinzu und wurde nach gleicher Inkubation wiederum ausgewaschen.

Der Antigen-Antikörper Komplex konnte durch Hinzufügen von Substrat sichtbar gemacht werden. Es bestand aus Salizylsäure (400 mg 5-Amino-2-Hydroxybenzoesäure ( $C_7H_7NO_3$ ) in 500 ml aqua dest. aufgelöst und zum Gebrauch mit 1 N NaOH auf pH 6 eingestellt) und war im Verhältnis 10:1 mit 0,05 %iger  $H_2O_2$ -Lösung gemischt worden. Die Ablesung der Titer erfolgte stets eine Stunde nach Zugabe des Substrates.

## B. Ergebnisse

Das aus dem Blut hochparasitärischer Mäuse und Hunde gewonnene, im Serum gelöste Antigen (A II) ließ sich säulenchromatographisch in drei Fraktionen auftrennen (Abb. 1), während das nach Hämolyse und Zentrifugation im Überstand gelöste intraerythrozytäre Antigen (A III) nur zwei Fraktionen ergab (Abb. 2). Die Anzahl der Fraktionen war bei allen Antigenen der drei Babesienarten gleich. Daher konnten sie in den verschiedenen serologischen Tests vergleichend geprüft werden.

Um die Eiweißbestandteile der Fraktionen genauer zu definieren, wurden Elphorgramme angefertigt, wobei die Proteine elektrophoretisch auf Celluloseacetatfolie getrennt und mit Hilfe des Elphormatschreibers ausgewertet wurden. Es stellte sich heraus, daß die Fraktion 1 hauptsächlich aus gamma- und beta-Globulinen besteht, während alle anderen Fraktionen im wesentlichen Albumine und nur zu einem geringen Teil alpha-Globuline enthalten.

In der Immunodiffusion, der Gegenstromelektrophorese und im ELISA-Test wurden die fraktionierten Antigene in zwei verschiedenen Versuchsreihen auf ihre serologische Spezifität geprüft (Tabelle 1). In der ersten Versuchsreihe wurden die Antigene gegen Babesien-spezifische Hochimmunseren getestet,

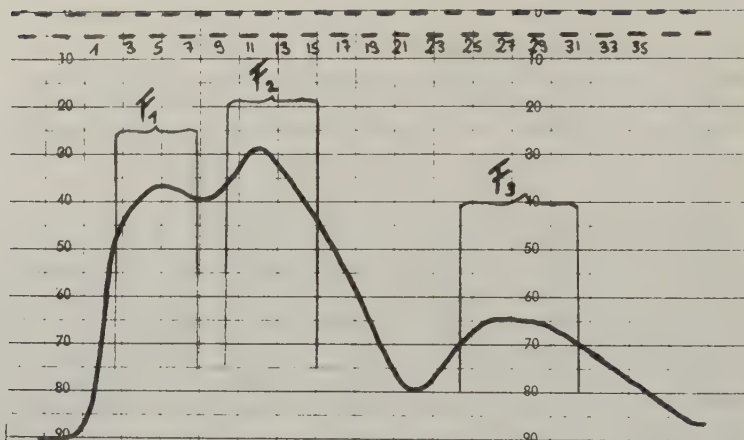


Abb. 1 Elutionskurve von Seren hochparasitämischer mit *Babesia rodhaini* infizierter Mäuse aufgetrennt an Ultrogel ACA 34 mit Darstellung der Fraktionen

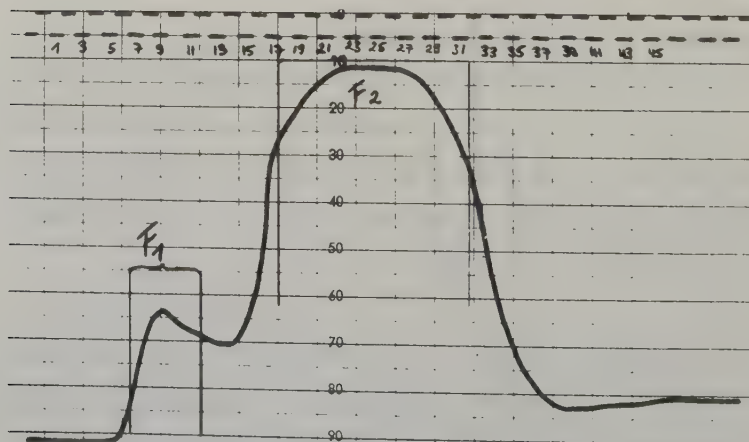


Abb. 2 Elutionskurve des intraerythrozytären Plasmas hochparasitämischer mit *Babesia canis* infizierter Hunde aufgetrennt an Ultrogel ACA 34 mit Darstellung der Fraktionen

die in Kaninchen, die keine Wirtstiere der verwendeten drei Babesienarten sind, produziert worden waren. Im Gegensatz dazu wurden in der zweiten Versuchsreihe Babesien-spezifische Hochimmunseren verwendet, die in Mäusen gegen *B. rodhaini* und *B. galagolata* und in Hunden gegen *B. canis* produziert worden waren, also in Tierarten, die mit diesen Babesia-Arten auch infizierbar sind. Die Immunisierung in Mäusen und Hunden wurde deshalb vorgenommen, weil das Material für die Immunisierung aus infizierten Tieren dieser Tierarten stammte und eine Antikörperbildung gegen Wirtstier-spezifisches Eiweiß vermieden werden sollte.

Da es sich bei der Gegenstromelektrophorese und Immunodiffusion um Agargelpräzipitationen handelt, sollen diese zusammen beschrieben werden. Zur weiteren Erläuterung der Tabelle 1 ist festzustellen, daß alle Antigen-Fraktionen an den Reaktionen beteiligt waren, jedoch nur die Fraktion 1 stets Präzipitate bildete und deshalb stellvertretend für alle Fraktionen dargestellt wird.

In der ersten Versuchsreihe reagierten in beiden Tests die Antiseren aus Kaninchen gegen *B. rodhaini* und *B. galagolata* sowohl mit *B. rodhaini*- als auch mit *B. galagolata*-Antigenen. Es bildeten sich dabei klare Präzipitationsbanden aus. Das Hochimmunserum gegen *B. canis* reagierte nur mit *B. canis*-Antigen. In der Immunodiffusion zeigte sich jedoch eine zu-

| Hochimmunseren aus                            |                                              | Ektoantigene von:                  |                                      |                                 |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Kaninchen (Ka), Maus (M), Hund (Hd)<br>gegen: |                                              | B. rodhaini<br>(AII 1-3, AIII 1-2) | B. galagolata<br>(AII 1-3, AIII 1-2) | B. canis<br>(AII 1-3, AIII 1-2) |
| Babesiennantigene                             | B. rodhaini (Ka)                             | +                                  | +                                    | 0                               |
|                                               | B. galagolata (Ka)                           | +                                  | +                                    | 0                               |
|                                               | B. canis (Ka)                                | neg. neg.                          | neg. neg.                            | +                               |
| Babesiennantigene                             | B. rodhaini (M)                              | +                                  | +                                    | 0                               |
|                                               | B. galagolata (M)                            | +                                  | +                                    | 0                               |
|                                               | B. canis (Hd)                                | neg. neg.                          | neg. neg.                            | +                               |
| Kontrollantigene                              | Erythrozytenhüllen, Leukozyten von Maus (Ka) | negativ                            | negativ                              | negativ                         |
|                                               | Erythrozytenhüllen, Leukozyten von Hund (Ka) | negativ                            | negativ                              | negativ                         |
| Negative Kontrolle mit Kaninchen-Normalserum  |                                              | negativ                            | negativ                              | negativ                         |

Tabelle 1 Reaktionen von säulenchromatographisch fraktionierten Ektoantigenen von Babesia rodhaini, B. galagolata und B. canis gegen Hochimmunseren aus Kaninchen, Mäusen und Hunden in der Immunodiffusion (+) und der Gegenstromelektrophorese (0)

sätzliche Präzipitation zwischen dem Antiserum gegen B. rodhaini- und dem B. canis-Antigen vom Hund.

Die zweite Versuchsreihe erbrachte die gleichen Ergebnisse mit der Ausnahme, daß das Hochimmunserum aus der Maus gegen B. rodhaini diesmal nicht in der Diffusion, sondern in der Gegenstromelektrophorese mit B. canis-Antigen vom Hund reagierte.

Die in der Tabelle angegebenen Kontrollantiseren reagierten mit keiner der verwendeten Antigenfraktionen.

Der ELISA-Test wurde mit den selben Hochimmunseren beider Versuchsreihen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 dargestellt, wobei die angegebenen Titer das arithmetische Mittel wiedergeben. Daraus wird ersichtlich, daß in der Fraktion 1 die Hochimmunseren von Kaninchen gegen B. rodhaini mit dem homologen Antigen hohe Titer (1:2560) erbrachten, während mit B. galagolata- und B. canis-Antigen um 1 Stufe niedrigere Titer erzielt wurden (1:1280). Antiseren gegen B. galagolata erbrachten mit allen drei Antigenen wesentlich niedrigere, kaum voneinander abweichende Titer (1:160 - 1:320). Antiseren gegen B. canis zeigten hingegen mit dem homologen Antigen hohe (1:2560), mit den heterologen Antigenen niedrige Titer (1:80 - 1:160).

| Hochimmunseren aus Kaninchen gegen:    | Ektoantigene von: |         |          |           |
|----------------------------------------|-------------------|---------|----------|-----------|
|                                        | B. rodh.          | B. gal. | B. canis | Fraktion: |
| B. rodhaini                            | 1:2560            | 1:1280  | 1:1280   | } F 1     |
| B. galagolata                          | 1: 160            | 1: 320  | 1: 320   |           |
| B. canis                               | 1: 80             | 1: 80   | 1:2560   |           |
| B. rodhaini                            | 1: 20             | 1: 10   | 1: 160   | } F 2     |
| B. galagolata                          | 1: 10             | 1: 10   | 1: 20    |           |
| B. canis                               | 1: 10             | ∅       | 1:1280   |           |
| B. rodhaini                            | 1: 320            | 1: 40   | 1: 160   | } F 3     |
| B. galagolata                          | 1: 40             | 1: 20   | 1: 40    |           |
| B. canis                               | 1: 40             | ∅       | 1: 320   |           |
| B. rodhaini                            | 1: 320            | 1: 20   | 1: 80    | } F 1     |
| B. galagolata                          | 1: 80             | 1: 10   | 1: 40    |           |
| B. canis                               | 1: 40             | ∅       | 1: 40    |           |
| B. rodhaini                            | 1: 20             | 1: 20   | 1: 160   | } F 2     |
| B. galagolata                          | ∅                 | 1: 10   | 1: 80    |           |
| B. canis                               | 1: 10             | ∅       | 1: 320   |           |
| Erythrozytenhüllen,<br>Leukozyten Maus | 1: 160            | 1: 160  | 1: 80    | } F 1     |
| Erythrozytenhüllen,<br>Leukozyten Hund | 1: 10             | 1: 10   | 1: 320   |           |
| Adjuvans                               | 1: 10             | ∅       | 1: 40    |           |
| Kaninchen Kontroll-<br>Negativserum    | ∅                 | ∅       | 1: 20    | ) F 1     |

Tabelle 2 ELISA-Antikörpertiter gegen säulenchromatographisch fraktionierte Ektoantigene von Babesia rodhaini, B. galagolata und B. canis in Kaninchen-Hochimmunserum

In der Fraktion 2 zeigte das Hochimmunserum gegen *B. rodhaini* niedrige Titer, nämlich mit *B. rodhaini*-Antigen 1:20 und mit *B. galagolata*-Antigen 1:10. Mit dem *B. canis*-Antigen wurde jedoch ein deutlich höherer Titer von 1:160 erreicht. Das Hochimmunserum gegen *B. galagolata* erbrachte mit allen Antigenen nur niedrige Titer (1:10 - 1:20). In der Reaktion des *B. canis*-Antiserums gegen das homologe Antigen wurde ein Titer von 1:1280 erzielt.

In der Fraktion 3 reagierte das Hochimmunserum gegen *B. rodhaini* mit dem homologen Antigen in einem Titer von 1:320, mit *B. galagolata* 1:40 und mit *B. canis* 1:160. Das *B. galagolata*-Antiserum zeigte wiederum mit allen Antigenen wechselnde Titer zwischen 1:10 und 1:80. *B. canis*-Hochimmunserum erreichte mit dem homologen Antigen einen Titer von 1:320.

Die erzielten Ergebnisse mit den intraerythrozytären Fraktionen F1 A III und F2 A III entsprachen in etwa denen der Fraktionen F2 und F3.

In der zweiten Versuchsreihe wurden die Hochimmunseren von Mäusen gegen *B. rodhaini* und *B. galagolata* bzw. die von Hunden gegen *B. canis* mit den jeweils homologen Antigenen getestet. Dabei zeigte sich, daß mit der Fraktion 1 alle Antiseren sowie alle Kontrollen mit den Antigenen positiv

reagierten. In den anderen Fraktionen waren nur unspezifische bzw. keine Titer ablesbar.

Das Kontrollimmunserum gegen gewaschene Erythrozytenhüllen und Leukozyten der Maus zeigte deutliche Titer mit den Antigenen der Fraktion 1 von B. rodhaini und B. galagolata, die Titer lagen im Mittel bei 1:160. Die Reaktion mit B. canis-Antigen vom Hund war um eine Titerstufe niedriger. Das Kontrollantiserum gegen Erythrozytenhüllen und Leukozyten vom Hund erbrachte mit den heterologen Antigenen sehr niedrige Titer (1:10), während mit dem homologen B. canis-Antigen ein hoher Titer erreicht wurde (1:320). Das Kontrollantiserum gegen Adjuvans zeigte mit B. rodhaini einen Titer von 1:10 und mit B. canis einen Titer von 1:40. Das negative Kontrollserum reagierte nur mit B. canis-Antigen in einem Titer von 1:20. In allen anderen Fraktionen waren mit den Kontrollseren keine positiven Titer erkennbar.

#### IV. Besprechung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Ektoantigene verschiedener Babesienarten in reiner Form darzustellen und damit die Möglichkeit einer artspezifischen Diagnose von Babesiosen in der Immunodiffusion, Gegenstromelektrophorese und im ELISA-Test zu untersuchen.

In meinen Versuchen gelang es, mit Hilfe von Antikörpern in Hochimmunseren säulenchromatographisch fraktionierte Ektoantigene von *Babesia rodhaini*, *B. galagolata* und *B. canis* in Seren von Mäusen und Hunden in der frischen Phase der Infektion bei hoher Parasitemie nachzuweisen. Ähnliche Ergebnisse erzielten sowohl SIBINOVIC und M. (1965), die ein serumlösliches Antigen in Pferden mit frischer *B. caballi*-Infektion fanden, als auch MAHONEY (1966), der ein lösliches Antigen im Serum hochparasitämischer Rinder mit *B. argentina*-Infektion nachwies. Übereinstimmend wird in beiden Untersuchungen berichtet, daß das Auftreten des Antigens an das akute Stadium der Erkrankung gebunden war, in dem eine große Anzahl der Erythrozyten von Parasiten befallen ist.

In der Immunodiffusion und Gegenstromelektrophorese reagierten die Antigene mit den gegen sie gerichteten Hochimmunseren in beiden Tests gleich intensiv und bildeten

deutliche Präzipitate. Es traten Kreuzreaktionen zwischen *B. rodhaini* und *B. galagolata* sowohl mit den Hochimmunsereen aus Kaninchen, als auch mit denen aus Mäusen auf.

Kreuzreaktionen sind zwischen nahe verwandten Babesienarten häufig. MAHONEY (1966) konnte zwei identische Teilantigene zwischen *B. argentina* und *B. bigemina* nachweisen. Auch RISTIC und M. (1971) fanden ein gemeinsames Antigen zwischen *B. canis* und *B. gibsoni*. SIBINOVIC und M. (1967) erhielten trotz säulenchromatographischer Auftrennung der Seren Kreuzreaktionen mit *B. equi*, *B. canis* und *B. rodhaini*. Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Tatsache, daß *B. rodhaini* und *B. galagolata* in Mäusen züchtbar sind, halte ich eine partielle Antigengemeinschaft zwischen den beiden Babesienarten für wahrscheinlich.

Als weitere Ursache für diese Kreuzreaktion wäre die Virulenz eines Erregers und die damit verbundenen möglichen Einflüsse auf artspezifische Reaktionen zwischen nahe verwandten Babesienarten zu diskutieren. EGER (1976) immunisierte Mäuse mit dem säulenchromatographisch aufgetrennten Ektoantigen der stark pathogenen Art *B. rodhaini* und fand, daß die Fraktion 1 eine gattungsspezifische Prämunität bewirkte. Nach Belastung mit *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata* zeigten die Tiere eine verlängerte Präpatenz sowie die halbe Höhe der maximalen Parasitaemie der Kontroll-

tiere. Einen geringeren Immunschutz sowohl gegen homologe als auch heterologe Belastung erhielt er mit dem weniger virulenten *B. galagolata*-Antigen. Dies zeigt, daß mit der virulenten Art *B. rodhaini* nicht nur gegen homologe, sondern auch gegen heterologe Antigene Antikörper produziert werden.

Auch die Kreuzreaktionen zwischen den Hochimmunseren gegen *B. rodhaini*- und dem *B. canis*-Antigen wäre zumindest teilweise auf der gleichen Basis zu erklären, zumal keine Reaktion zwischen dem Antiserum gegen die wenig virulente *B. galagolata* Art und dem *B. canis*-Antigen zu beobachten war. Die Tatsache, daß das *B. galagolata*-Antiserum mit dem *B. rodhaini*-Antigen reagierte, macht deutlich, daß ohne Berücksichtigung der Virulenz der Erreger beide Babesienarten gemeinsame Teilantigene besitzen.

Aus den Ergebnissen der Präzipitationsversuche ist weiterhin zu erkennen, daß das Hochimmunserum gegen *B. canis* nur mit dem homologen Antigen reagierte. Damit erweist sich das *B. canis*-Antigen als einziges der untersuchten, fraktionierten Antigene als artspezifisch.

Im Gegensatz zur Immunodiffusion und Gegenstromelektrophorese, mit deren Hilfe ich nur einen qualitativen Antikörpernachweis führte, besteht im ELISA-Test die Möglichkeit,

unterschiedlich starke Reaktionen deutlicher sichtbar zu machen, was durch abgestufte Serumtiter erreicht wird. Die Ergebnisse der Gelpräzipitationsversuche wurden im ELISA-Test weitgehend bestätigt.

Auch hier traten starke Kreuzreaktionen zwischen *B. rodhaini* und *B. galagolata* auf. Dabei ist zu bemerken, daß mit dem Hochimmunserum gegen *B. rodhaini* und dem homologen Antigen in allen Fraktionen ein um 1 - 3 Stufen höherer Titer erzielt wurde als mit dem heterologen *B. galagolata*-Antigen. Dies ist wahrscheinlich wiederum auf die größere Virulenz von *B. rodhaini* zurückzuführen. Die Titerunterschiede sind nach meinem Dafürhalten jedoch noch zu gering, um beide Babesienarten klar serologisch differenzieren zu können.

Die Hochimmunseren gegen *B. canis* erbrachten mit den homologen Antigenen hohe Titer, während mit den heterologen Babesienantigenen aus der Maus nur niedrige Titer erreicht wurden. Diese hohen Titerunterschiede gestatten eine serologische Differenzierung von *B. canis* auf der einen Seite und *B. galagolata* und *B. rodhaini* auf der anderen Seite. Dies steht im Widerspruch zu den von SIBINOVIC und M. (1967) gefundenen Kreuzreaktionen zwischen *B. rodhaini* und *B. canis*.

Weiterhin auffallend war, daß die Hochimmunseren gegen Mäuse-Babesien mit dem *B. canis*-Antigen teilweise höhere

Titer erbrachten als mit den homologen und heterologen Antigenen von *B. rodhaini* und *B. galagolata*. Dagegen wies das *B. canis*-Antiserum mit den beiden Mäuse-Babesienantigenen niedrigere Titer auf. Es wäre also doch denkbar, daß auch zwischen *B. canis* und den beiden anderen untersuchten Babesienarten einige Teilantigene identisch sind.

Die hohen Titer der Fraktion 1 im ELISA-Test bestätigen die Ergebnisse der Immunodiffusion und Gegenstromelektrophorese, wo die Fraktion 1 am häufigsten Präzipitate bildete. Auch zeigten die Kontrollantiseren nur Titer mit den Antigenen der Fraktion 1, während mit allen anderen Fraktionen keine Titer erkennbar waren. Es dürften also in der Fraktion 1 antigene Substanzen vorhanden sein, die in den Hochimmunserenspendern eine Antikörperproduktion bewirkten. Bei diesen antigenen Substanzen könnte es sich um Proteine handeln, da nach elektrophoretischer Auftrennung die Elphorgramme ergaben, daß die Fraktion 1 hauptsächlich aus beta- und gamma-Globulinen besteht, während alle anderen Fraktionen im wesentlichen Albumine und nur geringe Anteile an alpha-Globulinen aufweisen. Dies ist eine Bestätigung der Ergebnisse von SIBINOVIC und M. (1967), die nach säulenchromatographischer Auftrennung und anschließender Gradientenzentrifugation zwei Fraktionen erhielten. Sie befreiten die Antigene von allen Serumbestandteilen, außer beta<sub>1</sub>-, beta<sub>2</sub>- und gamma-Globulinen. Die Fraktion 1 wander-

te im elektrischen Feld mit der Geschwindigkeit eines gamma-Globulins, Fraktion 2 verhielt sich dagegen wie ein beta-Globulin. Auch TÜLLMANN (1976) bewies in dem Ansatz der Fraktionen mit Anti-Maus-Globulin in der Immunoэлектроphorese, daß die reagierenden Fraktionen jeweils den Gesamt-Globulinbereich einnahmen.

Es wäre demnach denkbar, daß in den Seren der mit gewaschenen Erythrozytenhüllen und Leukozyten immunisierten Kontrolltiere hauptsächlich Antikörper gegen beta- und gamma-Globuline enthalten waren. Durch die Konzentration der beta- und gamma-Globuline in der Fraktion 1 wären daher die Präzipitationen im Agar-Gel und die hohen Titer der Kontrollseren zu erklären.

Im ELISA-Test zeigte sich weiterhin, daß mit Hochimmunseren, die aus der selben Tierart stammten wie die serumlöslichen Babesienantigene, in der Fraktion 1 alle Reaktionen, auch die der Kontrollen, positiv ausfielen. Es war daher unmöglich, Titer abzulesen. Der Grund hierfür liegt in der oben erwähnten hohen Konzentration an Globulinen in der Antigen-Fraktion 1, die mit dem gegen die entsprechende Tierart gerichteten und mit Peroxydase gekoppelten Antiglobulin reagierte und damit eine falsch positive Reaktion hervorruft. In allen anderen Fraktionen, die nur alpha-Globuline und Albumine enthielten, waren hingegen keine ( $\emptyset$ ) oder nur unspezifische Titer zu erkennen.

Verwunderlich ist, daß das intraerythrozytäre Antigen A III keine stärkeren Reaktionen zeigte. SIBINOVIC und M. (1969) kamen in ihren Untersuchungen über die Wirkung der Serumantigene auf parasitierte und intakte Erythrozyten zu dem Ergebnis, daß es im akuten Stadium der Erkrankung mit hoher Parasitaemie zu einer Anreicherung von Stoffwechselprodukten der Parasiten in den infizierten Erythrozyten und zur Diffusion dieser antigen wirkenden Substanzen in das Serum kommt.

Man könnte demnach annehmen, daß Ektoantigene, die aus Erythrozyten gewonnen wurden, stärkere Reaktionen hervorrufen, als solche, die aus Serum stammen. Die erzielten Ergebnisse beweisen jedoch das Gegenteil, da kein Unterschied zu den Serumfraktionen F1 und F2 besteht. Es wäre möglich, daß sich vom Zeitpunkt der Infektion an bis zum Parasitaemiehöhepunkt durch Diffusion bzw. durch Platzen der parasitierten Erythrozyten mehr antigenes Material im Serum angereichert hat, als durch die Hämolyse von Erythrozyten gewonnen werden kann.

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, daß die Immunodiffusion, die Gegenstromelektrophorese und der ELISA-Test in Verbindung mit den verwendeten fraktionierten Ektoantigenen zum Nachweis von Babesienantikörpern geeignet sind. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß *B. rodhaini* eine

engere serologische Verwandtschaft zu *B. galagolata* aufweist als zu *B. canis*. Die Reinheit der verwendeten fraktionierten Antigene und möglicherweise die serologischen Methoden erwiesen sich jedoch als nicht ausreichend, um eine serologische Artdifferenzierung von Babesien zu erreichen.

Der ELISA-Test wurde von mir zum ersten Mal in dieser Intensität auf seine Anwendbarkeit in der Babesienserologie geprüft. Für die artspezifische Diagnostik von Babesiosen ist er nur bedingt geeignet. Wegen seiner Unabhängigkeit von teuren und aufwendigen Apparaturen und wegen der guten Reproduzierbarkeit seiner Ergebnisse ist der Test insbesondere für Felduntersuchungen geeignet und zu empfehlen.

## V. Zusammenfassung

Es wurden Ektoantigene von *Babesia rodhaini*, *B. galagolata* und *B. canis* aus dem Serum und dem Erythrozytenplasma hochparasitärischer Mäuse und Hunde gewonnen und nach säulenchromatographischer Auftrennung auf ihre serologischen Eigenschaften in der Immunodiffusion, Gegenstromelektrophorese und im ELISA-Test untersucht. In Mäusen, Hunden und Kaninchen wurden Hochimmunseren gegen die verwendeten Babesienarten hergestellt.

In der Immunodiffusion und Gegenstromelektrophorese konnten präzipitierende Antikörper in allen Hochimmunseren nachgewiesen werden. Zwischen *B. rodhaini* und *B. galagolata* traten starke Kreuzreaktionen auf, während zwischen *B. rodhaini* und *B. canis* schwächere Reaktionen zu beobachten waren.

Im ELISA-Test wurden diese Ergebnisse weitgehend bestätigt. Hohe Titerunterschiede ermöglichten eine klare Differenzierung zwischen *B. canis* einerseits und *B. rodhaini* und *B. galagolata* andererseits. Weniger markante serologische Unterschiede zeigten sich mit *B. rodhaini* und *B. galagolata*, was auf eine engere antigene Verwandtschaft zurückzuführen sein dürfte. Wegen seiner Unabhängigkeit von aufwendigen Apparaturen und wegen seiner unkomplizierten praktischen Anwendung ist der ELISA-Test insbesondere für Felduntersuchungen geeignet und zu empfehlen.

## Summary

Serological investigations into ectoantigens of Babesia rodhaini, B. galagolata and B. canis by means of immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis and in the ELISA-test.

The ectoantigens were collected from serum and erythrocyte plasma of highly parasitised mice and dogs. After column-fractionation the antigens were examined on their serological properties in the immunodiffusion-, counterimmunoelectrophoresis- and in the ELISA-test. Hyperimmunsera were produced by immunizing mice, dogs and rabbits with antigens of the three Babesia-species.

By means of immunodiffusion and counterimmunoelectrophoresis precipitating antigens could be detected in all hyperimmunsera. Intense cross-reactions occurred between B. rodhaini and B. galagolata while only insignificant reactions were observed between B. rodhaini and B. canis.

The ELISA-test confirmed these results. High differences in titers made it possible to differentiate B. canis from the other two Babesia species. B. rodhaini, however, could not be readily distinguished from B. galagolata which may indicate their closer antigenic relationship. Due to its independence to costly apparatus and its uncomplicated practical use the ELISA-test is suitable for serological field surveys of babesiosis.

VI. Literaturnachweis

1. Cox, F.E.G., S.A. Turner (1970): Antibody levels in mice infected with *B. microti*.  
Ann. Trop. Med. Parasit. 64, 167-173
2. Eger, R. (1976): Versuche zur Immunisierung von Mäusen gegen *B. rodhaini*, *B. musculi*, *B. microti* und *B. galagolata*.  
Vet. Med. Diss., München
3. Engvall, E., P. Perlmann (1972): Enzyme-Linked-Immuno-sorbent-Assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes.  
J. Immunol. 109, 129-135
4. Ferris, D.H., R. Todorovic, M. Ristic (1968): Significance and application of babesial and plasmodial ectoantigens to comparative medicine.  
J. Am. Vet. Med. Ass. 153, 1888-1896
5. Goodger, B.V. (1971): Preparation and assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis.  
Austr. Vet. J. 47, 251-255
6. Hirato, K., N. Ninomiya, Y. Uwano, T. Kutil (1945): Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmosis.  
Jap. J. Vet. Sci. 7, 204-205
7. Leeflang, P., N.M. Perié (1972): Comparative immunofluorescent studies on 4 *Babesia* spp. of cattle.  
Res. Vet. Sci. 13, 342-346
8. Mahoney, D.F. (1966): Circulating antigens in cattle infected with *B. bigemina* or *B. argentina*.  
Nature London 211, 422-429
9. Mahoney, D.F., B.V. Goodger (1969): *Babesia argentina*. Serum changes in infected calves.  
Expl Parasit. 24, 375-382

10. Mahoney, D.F., B.V. Goodger (1972): Babesia argentina: Immunogenicity of plasma from infected animals.  
Expl Parasit. 32, 71-85
11. Ouchterlony, Ö. (1965): Gel diffusion techniques. Immunchemie (15. Colloquium Ges. Phsiol. Chem.) Springer Verlag Berlin
12. Ristic, M., S. Sibinovic (1964): Equine babesiosis: Diagnosis by a precipitation in gel and by a one-step fluorescent antibody-inhibition test.  
Am. J. Vet. Res. 25, 1519-26
13. Ristic, M., A.R. Smith, M.G. Groves (1971): Babesia canis and B. gibsoni: soluble and corpuscular antigens isolated from blood of dogs.  
Expl. Parasit. 30, 385-392
14. Ruitenberg, B.J., P.A. Steerenberg, B.J.M. Brosi (1975): Micro-System for the application of ELISA in the serodiagnosis of Trichinella spiralis infections.  
Medikon 4, 30-31
15. Sibinovic, K.H. (1966): Immunologic properties of soluble antigens from blood of animals with acute babesiosis.  
Ph. D. Thesis, University of Illinois, Urbana Illinois
16. Sibinovic, K.H., R. Mc Lead, M. Ristic, S. Sibinovic, W.H. Cox (1967 ): A study of some of the physical, chemical and serological properties of antigens from sera of horses, dogs and rats with acute babesiosis.  
J. Parasit. 53, 919-923
17. Sibinovic, K.H., M. Ristic, S. Sibinovic, T.N. Phillips (1965): Equine babesiosis: Isolation and serologic characterization of a blood serum antigen from acutely infected horses.  
Am. J. Vet. Res. 26, 147-153
18. Sibinovic, K.H., S. Sibinovic, M. Ristic, W.H. Cox (1969): In vivo and in vitro effects of serum antigens of babesial infections and their antibodies on parasitized and normal erythrocytes.  
Ann. Trop. Med. Parasit. 3, 327-336

19. Todorovic, R.A. (1975): Serological diagnosis of babesiosis: A Review.  
Trop. Anim. Hlth Prod. 7, 1-14
20. Todorovic, R.A., L.G. Adams (1971): Serodiagnosis of babesiosis.  
Proc. XIX World Vet. Congress, Mexico City, Mexico, 15.-22. August 71, 3, 1114-1116
21. Tüllmann, K. (1976): Untersuchungen über antigene Eigenschaften von *B. rodhaini* und *B. musculi* in der Immunodiffusion, Gegenstromelektrophorese und Immunelektrophorese am Modell der Maus.  
Vet. Med. Diss., München
22. Vizcaino, O.G., R.A. Todorovic (1973): Produccion de antigenos solubles de *B. argentina* y *B. bigemina* para pruebas de inmunologia.  
Proc. VII, Panam. Congress of Vet. Med. and Zootechnics, Bogota, Columbia, 23.-28. Juli 1973, 38-39
23. Voller, A., A. Bartlett, D.E. Bidwell (1976): Enzyme immunoassays for parasitic diseases.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 70, 98-106
24. Zwart, D., M.C. Van Den Ende, B. Kovwenhoven, J. Buys (1968): The difference between *B. bigemina* and Dutch strain of *B. major*.  
Tijdschr. Diergeneesk. 93, 126-140 .

## Lebenslauf

Am 15. März 1948 wurde ich als Sohn des Agr. Ing. und Landwirts Eberhard-Siegfried Graf zu Dohna-Schlodien und seiner Gemahlin Susanne, geb. Gilmer, in Bern/Schweiz geboren. Meine Kindheit verbrachte ich auf dem Hof meiner Eltern, Gut Rottenried bei Gilching/Obb., wo ich vier Jahre die Volksschule besuchte. Danach wechselte ich für drei Jahre auf die Oberschule, Institut Dr. Greite in Feldafing/Obb. Von Sommer 1962 bis Herbst 1965 besuchte ich die High School Dublin, da meine Eltern nach Irland gezogen waren. Im Herbst 1965 trat ich in das Paul-Gerhardt-Gymnasium in Laubach/Hessen ein und legte dort im Sommer 1968 die Reifeprüfung ab. Von Herbst 1968 bis 1970 besuchte ich im Trinity College, Dublin den Vorbereitungskurs für das Veterinärstudium. Im Wintersemester 1970 immatrikulierte ich mich an der Universität München für das Studium der Tiermedizin und legte dort das Staatsexamen am 5. April 1976 ab.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. J. Boch danke ich  
sehr herzlich für die Überlassung des Themas  
und die hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Weiland,  
der mir bei der Durchführung dieser Arbeit je-  
derzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Fräulein Schmöger danke ich für die liebens-  
würdige Hilfe in technischen Fragen.









